

KOREAN PATENT ABSTRACTS XML 2(1-2)

Save



Please Click here to view the drawing

Korean FullDoc

(19) KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

KOREAN PATENT ABSTRACTS

(11)Publication number: 1020040030371 A
(43)Date of publication of application: 09.04.2004

(21)Application number: 1020030068446

(71)Applicant: KIM, KYUNG YEOL
(72)Inventor: KANG, HYEONG WON
KIM, KYUNG YEOL
KIM, SANG TAE

(22)Date of filing: 01.10.2003

(51)Int. Cl. A61K 35 /78

(54) PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR TREATING ALLERGIC DISEASE

(57) Abstract:

PURPOSE: Provided is a pharmaceutical composition which is effectively used in treating allergic diseases such as allergic dermatitis, atopic rhinitis, chronic asthma, and immune hyperactivity without ill effects, such as dyspepsia, vertigo and cardialgia, to the body.

CONSTITUTION: A pharmaceutical composition for treating allergic disease comprises Coix lachryma, Mori cortex radicis, Houttuynia cordata thunb, Platycodi radix, Rehmannia radix, Lonicera japonica, Saururus chinensis baill,

ginger, dried orange peel, Atractylodes rhizoma, Atractylodes japonica, licorice, Astragalus membranaceus, peppermint, Allium fistulosum, Zizyphus jujuba miller, and Crassostrea gigas.

copyright KIPO 2004

Legal Status

Date of request for an examination (20031001)

Notification date of refusal decision (00000000)

BEST AVAILABLE COPY

(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)

| | | |
|---------------|------------------------------------|-----------------|
| (51) Int. Cl. | (11) 공개번호 | 10-2004-0030371 |
| A61K 35/78 | (43) 공개일자 | 2004년04월09일 |
| (21) 출원번호 | 10-2003-0068446 | |
| (22) 출원일자 | 2003년10월01일 | |
| (30) 우선권주장 | 1020020060006 2002년10월02일 대한민국(KR) | |
| | 1020020068267 2002년11월05일 대한민국(KR) | |
| (71) 출원인 | 김경렬 | |
| | 대한민국 | |
| | 560-764 | |
| | 전라북도 전주시 완산구 서신동 동아아파트 104-1401 | |
| (72) 발명자 | 김경렬 | |
| | 대한민국 | |
| | 560-764 | |
| | 전라북도 전주시 완산구 서신동 동아아파트 104-1401 | |
| | 김상태 | |
| | 대한민국 | |
| | 142-076 | |
| | 서울특별시강북구수유6동도현빌리지다동322호 | |
| | 강형원 | |
| | 대한민국 | |
| | 435-030 | |
| | 경기도군포시당정동LG아파트109-401 | |
| (74) 대리인 | 노재철 | |
| (77) 심사청구 | 있음 | |
| (54) 출원명 | 알레르기성 질환 치료용 약학조성물 | |

요약

본 발명은 의이인, 상백피, 어성초, 길경, 생지황, 금은화, 삼백초, 생강, 진피, 백출, 창출, 황기, 감초, 박하, 적작, 파, 대추 및 모려의 생약을 유효성분으로 함유하는 알레르기성 질환 치료용 약학조성물과 그의 제조방법을 제공함으로써, 원인과 체질을 불문하고 한 처방으로 알레르기성 질환을 다스릴 수 있으며, 폐(肺), 비(脾), 신(腎), 위(胃), 대장(大腸)에 작용하여 알레르기 질환의 근본적인 치료가 가능하고, 장기간 계속 사용하더라도 소화장애, 어지러움증 및 속쓰림 등의 부작용이 없으며, 알레르기성 질환이 염증반응으로 진행되어 유발되는 알레르기성 비염, 아토피성 피부염, 만성 천식 및 면역 과민반응 증상 등의 알레르기성 질환을 치료하는 효과가 있는 발명이다.

대표도

도1

색인어

알레르기, 의이인, 상백피, 어성초, 길경, 생지황, 금은화, 삼백초, 생강, 진피, 백출, 창출, 황기, 감초, 박하, 적작, 파, 대추, 모려

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명에 따른 약학조성물에 대한 과산화지질(過酸化脂質)생성 억제작용 평가를 나타낸 그래프,

도 2는 본 발명에 따른 약학조성물에 대한 쥐 경구투여에서의 항(抗)알레르기 작용(PCA법) 평가를 나타낸 그래프,

도 3은 본 발명에 따른 약학조성물에 대한 5-리포키시게나제 저해작용 평가를 나타낸 그래프,

도 4는 본 발명에 따른 약학조성물에 대한 항(抗)히스타민 작용 평가를 나타낸 그래프,

도 5는 본 발명에 따른 약학조성물에 대한 트라이나이트로페닐(TNP)의 특이적 면역조정능력반응 실험을 나타낸 그래프,

도 6은 본 발명에 따른 약학조성물에 대한 호산구 증가 억제 실험을 나타낸 그래프,

도 7은 본 발명에 따른 약학조성물에 대한 비염 유도쥐내 폐세기관지 임파구수를 나타낸 그래프,

도 8은 본 발명에 따른 약학조성물에 대한 폐세기관지내 임파구의 tryphan blue 염색을 형태학적으로 나타낸 현미경 확대도(×200),

도 9는 본 발명에 따른 약학조성물에 대한 폐세기관지내 면역세포화학분석법으로 나타낸 형광현미경 확대도(×200)이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 알레르기성 질환 치료용 생약조성물 및 그의 제조방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 의이인, 상백피, 어성초, 길경, 생지황, 금은화, 삼백초, 생강, 진피, 백출, 창출, 황기, 감초, 박하, 적작, 파, 대추 및 모려의 생약을 유효성분으로 함유하며, 한의학적인 진단방법에 따른 체질과 변증에 관계없이 알레르기성 비염, 아토피성 피부염, 만성 천식 또는 면역 과민반응 증상 등을 치료할 수 있는 알레르기성 질환 치료용 약학조성물 및 그의 제조방법에 관한 것이다.

일반적으로 알레르기 질환의 치료는 약물요법을 이용하는데 항히스타민제, 항생제 또는 호르몬제 등 화학약품이 주로 사용되고 있으며, 상기와 같은 치료제를 복용할 때 그 독성으로 말미암아 소화장애, 어지러움증 및 속쓰림 등의 부작용이 나타나고, 장기 복용시 알레르기 항원에 대한 내성을 가짐으로써 알레르기 증상이 만성화될 수 있는 문제점이 있어 왔다.

한편, 한의학에서는 알레르기 질환은 풍한(風寒), 풍열(風熱), 습열(濕熱), 조열(燥熱) 등의 외인(外因), 폐허(肺虛), 비허(脾虛), 신허(腎虛) 등의 내인(內因) 또는 음식노역(飮食勞役), 일광 등의 부내외인(不內外因)의 원인에 의한 것이라 하며, 특히 임상에서는 알레르기 질환은 비기허약(脾氣虛弱)으로 인한 경우가 가장 많아 알레르기 질환과 소화기계와의 연관성에 관한 문헌이 다수 보고되어 있다.

이에 최근 한의학계에서는 생약성분을 이용한 알레르기 질환 치료제의 개발이 시도되어지고 있다.

국내특허등록 제354608호에는 형개연교탕(荊芥連翹湯)을 기본방으로 하고 중이염과 풍열을 다스리는 실증치료약재에 보기제가 가미된 처방으로 급만성의 알레르기성 비염, 천식 및 피부염과 중이염 등의 알레르기 질환을 치료하는 조성물이 개시되어 있으나, 상기의 처방은 반드시 식후에 복용하게 되어 있고, 위장상태를 고려하지 않은 처방으로 변증유형에 따라 풍열이 원인이 아닌 경우에는 효과가 미미하거나 차이가 있을 수밖에 없다.

또한 최근 한의학계의 알려지성 비염에 대한 연구를 살펴보면, 그 성과물로서 가미통규탕(加味通竅湯), 황연통성산(黃連通聖散), 가미방풍통성산(加味防風通聖散), 통관산(通關散), 형개연교탕가미(荊芥連翹湯加味) 등의 투여시 본 질환에 대한 유의성이 이미 보고된 바가 있으나 효과가 미미하거나 체질과 변증에 맞춰 복용해야 한다는 불편감이 있었다.

특히 오늘날 알레르기 질환이 증가는 오염된 공기 뿐만 아니라 식생활의 문제, 즉, 인스턴트 식품, 패스트푸드, 탄산음료 등의 과잉섭취로 인한 위중불화(胃中不和)로 이어져 질환으로 이어지는 것으로 알려져 있으며, 한의학상으로 보면, 폐(肺)는 기(氣)를 주관하고 비(脾)는 기(氣)의 흐름을 발생시키는 근원점이 되며 폐(肺)와 비(脾) 두 장기는 기(氣)와 수진(水津)의 두 방면에 있어 서로 밀접한 관계가 있으며 병리상에 있어 서로 역시 상호영양을 주고 있다. 즉, 비기(脾氣)가 허약하면 폐기(肺氣) 부족에 이르러 폐(肺)의 선허(宣降)작용이 실조(失調)되어 진액(津液)이 정체하므로 한습(寒濕)이 비구(鼻口)에 오랫동안 응결되어 알레르기성 비염이 발생하게 된다. 또한 폐와 장은 장부상합의 응양, 표리의 상응관계로 "폐는 대장과 짝이 되고, 장은 피부와 상응한다(영추, 본장편)"고 하여 소화기관의 문제와도 밀접한 연관이 있다.

그리고 알레르기성 질환은 여러 알레르기 유발인자에 의해 인체 면역체계를 과도하게 항진시켜 대식세포와 같은 면역세포에서 TNF- α (tumor necrosis factor- α), IL-1(interleukin-1), IL-6(interleukin-6), 프로스타글란딘(prostaglandin), 루코트리엔(leucotriene) 및 산화질소(nitric oxide, NO)와 같은 염증유발물질을 과도하게 유도하여 염증반응으로 진행되어 알레르기성 비염, 아토피성 피부염, 만성 천식 및 면역 과민반응 증상 등을 일으키는 것으로 알려져 있다.

이에 본 발명자들은 폐(肺), 비(脾), 신(腎), 위(胃), 대장(大腸)에 작용하여 알레르기 질환의 근본적인 치료가 가능하고, 원인과 체질을 불문하고 한 처방으로 알레르기 질환을 다스릴 수 있는 동시에 염증유발인자의 생성을 억제하는 조성물을 개발하기 위하여, 장(腸)과 폐(肺)를 튼튼하게 하는 의이인, 상백피, 어성초, 길경; 비위를 돕고 장을 도우며 기를 잘 돌게하는 생지황, 금은화, 삼백초, 생강, 진피, 백출, 창출, 황기, 감초, 박하, 적작; 및 파, 대추 및 모려의 생약을 더하여 실험한 결과, 상기의 생약을 유효성분으로 함유하는 생약조성물은 상기 목적하는 효과 뿐만 아니라 LPS로 자극 받은 세포주에서 NO의 생산, PGE2의 생산, TNF의 생산 및 전사인자 NF- κ B의 활성화를 억제하여 알레르기성 질환과 관련있는 알레르기성 비염, 아토피성 피부염, 만성 천식 및 면역 과민반응 증상 등을 치료할 수 있음을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

따라서 본 발명은 의이인, 상백피, 어성초, 길경, 생지황, 금은화, 삼백초, 생강, 진피, 백출, 창출, 황기, 감초, 박하, 적작, 파, 대추 및 모려의 생약을 유효성분으로 함유하는 알레르기성 질환 치료용 약학조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

또한 본 발명은 한의학상 원인과 체질을 불문하고 알레르기성 질환 치료에 사용될 수 있는 알레르기성 질환 치료용 약학조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

아울러 본 발명은 의이인, 상백피, 어성초, 길경, 생지황, 금은화, 삼백초, 생강, 진피, 백출, 창출, 황기, 감초, 박하, 적작, 파, 대추 및 모려의 생약을 유효성분으로 함유하는 약학조성물을 이용함으로써 폐(肺), 비(脾), 신(腎), 위(胃), 대장(大腸)에 작용하여 장기간 계속 사용하더라도 소화장애, 어지러움증 및 속쓰림 등의 부작용을 나타내지 않는 알레르기성 질환 치료용 약학조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

·발명의 구성 및 작용

상기와 같은 목적을 달성하기 위해서 본 발명은 의이인, 상백피, 어성초, 길경, 생지황, 금은화, 삼백초, 생강, 진피, 백출, 창출, 황기, 감초, 박하, 적작, 파, 대추 및 모려의 생약을 유효성분으로 함유하는 알레르기성 질환 치료용 약학조성물을 제공한다.

또한 본 발명은 한의학상 원인과 체질을 불문하고 알레르기성 질환 치료에 사용될 수 있는 알레르기성 질환 치료용 약학조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

아울러 본 발명은 폐(肺), 비(脾), 신(腎), 위(胃), 대장(大腸)에 작용하여 장기간 계속 사용하더라도 소화장애, 어지러움증 및 속쓰림 등의 부작용을 나타내지 않는 알레르기성 질환 치료용 약학조성물을 제공한다.

이와 같은 본 발명을 더욱 상세히 설명하면 다음과 같다.

본 발명은 의이인, 상백피, 어성초, 길경, 생지황, 금은화, 삼백초, 생강, 진피, 백출, 창출, 황기, 감초, 박하, 적작, 파, 대추 및 모려의 생약을 유효성분으로 함유하는 알레르기성 질환 치료용 약학조성물에 관한 것이다.

본 발명에서 사용되는 생약재 의이인은 청폐(淸肺)작용을 하고, 비(脾)를 도우며, 폐옹(肺癰), 장옹(腸癰)을 치료하는 데 사용하고, 배농(排膿), 소종(消腫)의 효능이 있으며, 수종각기(水腫脚氣)를 치료하는 데 사용한다. 상백피는 폐의 열을 내리고 기침을 멈추며 숨찬 증세를 낮게 하여 기관지염에 쓰이며, 혈압을 내리는 것을 도와준다. 어성초는 해독작용이 뛰어나며 소염작용을 하고 장의 기능을 활발하게 해주며 피를 맑게 해준다. 길경은 폐경에 작용하여 담을 삭이고 기침을 멈추며 폐기를 잘 통하게 한다. 생지황은 해독작용을 하고 장을 녹여주며 출혈을 멈추게 하며 열을 내린다. 금은화는 청열 및 해독작용을 하고 염증을 삭이고 중기의 고름을 배출시키는 작용을 한다. 삼백초는 해독 및 이뇨작용이 매우 뛰어나고 염증을 없애며 항암작용이 있고, 변비와 속변을 없애주고 고혈압과 동맥경화 치료와 예방에 사용한다. 생강은 신진대사기능을 촉진하며 진해작용을 하고 위를 보하며 소화를 돕고, 열미에 약효가 좋으며 혈중 콜레스테롤의 상승을 억제한다. 진피는 비장과 폐에 작용하고 기의 순환을 도와 식용부진, 구토, 기침 등을 다스린다. 백출은 비위를 든든하게 하여 먹은 것을 잘 삭이고 기를 보하며 담을 멈춘다. 창출은 습을 없애며 비증을 낮게하고 위를 고르게 하여 먹은 것을 잘 삭인다. 황기는 강장·지한(止汗)·이뇨(利尿)·소종(消腫) 등의 효능이 있어 신체허약·피로권태·기혈허탈(氣血虛脫)·탈항(脫肛)·자궁탈·내장하수·식은땀 등에 약효가 좋다. 감초는 비위를 보하고 원기를 도우며, 윤패, 청열, 해독, 제약을 조화시키는 효능이 있다. 박하는 소산풍열, 청리인후의 효능이 있다. 적작은 활혈산어(活血散瘀), 혈열망행(血熱妄行), 경폐(經閉), 창옹종독(癰腫癰毒) 등 기어혈제(氣瘀血劑) 작용을 증강시킨다.

이에 본 발명은 항알레르기 효과가 입증된 생약으로서 각각 장(腸)과 폐(肺)를 튼튼하게 하는 의이인, 상백피, 어성초, 길경과 비위를 돕고 장을 도우며 기를 잘 돌게하는 생지황, 금은화, 삼백초, 생강, 진피, 백출, 창출, 황기, 감초, 박하, 적작에 파, 대추 및 모려의 생약을 유효성분으로 함유하는 알레르기성 질환 치료용 약학조성물을 제조한 것이다.

본 발명의 약학조성물은 하기 실시예에서 확인할 수 있는 바와 같이 LPS로 자극 받은 세포주에서 NO의 생산, PGE2의 생산, TNF의 생산 및 전사인자 NF- κ B의 활성화를 억제하여 알레르기성 질환과 관련있는 알레르기성 비염, 아토피성 피부염, 만성 천식 및 면역 과민반응 증상 등을 치료할 수 있다.

또한 상기 생약재를 유효성분으로 함유하는 본 발명의 약학조성물은 한의학상 원인과 체질을 불문하고 알레르기성 질환 치료에 사용될 수 있으며, 아울러 본 발명은 폐(肺), 비(脾), 신(腎), 위(胃), 대장(大腸)에 작용하여 알레르기 질환의 근본적인 치료가 가능하고, 장기간 계속 사용하더라도 소화장애, 어지러움증 및 속쓰림 등의 부작용을 나타내지 않는다.

본 발명은 상기 생약재 의이인, 상백피, 어성초, 길경, 생지황, 금은화, 삼백초, 생강, 진피, 백출, 창출, 황기, 감초, 박하, 적작, 파, 대추 및 모려의 생약을 혼합하여 물을 첨가하여 열수추출하거나 알코올 수용액을 첨가하여 추출한 후 감압, 분무 또는 동결 건조하여 추출물을 제조할 수 있으며, 열수추출은 정제수를 가한 후, 80℃에서 4 시간씩 2회 열수 추출할 수 있으며, 알코올 수용액을 첨가할 때는 알코올 수용액은 5 내지 100 % 에탄올 또는 메탄올 중에서 선택하여 사용할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 70% 에탄올을 사용하는 것이 좋다. 또한 본 발명은 상기 추출물을 감압농축기로 농축한 후, 분무 또는 동결 건조하여 상기 추출물의 분말을 얻을 수 있다.

본 발명에 따른 약학 조성물은 생약재 의이인에 대하여 상백피, 어성초 및 길경은 각각 1 : 0.7~1, 생지황, 금은화, 삼백초, 생강, 진피, 백출, 창출, 황기, 감초, 박하 및 적작은 각각 1 : 0.1~1 이고, 대파는 1 : 1~10, 대추는 1 : 0.1~1, 모려는 1 : 0.01~0.1이며, 보다 바람직하게는 생약재 의이인에 대하여 상백피는 1 : 1, 어성초, 길경은 각각 1 : 0.75, 생지황, 금은화, 삼백초, 생강, 진피, 백출, 창출, 황기, 감초는 각각 1 : 0.5, 박하는 1 : 0.4, 적작은 1 : 0.2, 대파는 1 : 5, 대추는 1 : 0.4 및 모려는 1 : 0.01이다.

아울러 본 발명은 필요에 따라 현상, 건강, 반하, 연교, 지실, 용안약, 신이, 세신, 창이자, 하수오, 백지, 방풍, 사삼, 황기, 계지, 단삼, 소자, 포공영, 시호, 오배자, 자초, 형개, 곽향에서 선택된 1종 이상의 생약을 첨가하여 제조할 수 있으며, 이들은 생약재 의이인에 대하여 각각 1: 0.1~1 중량비로 혼합될 수 있다.

또한 본 발명은 기존에 이미 약제로 사용되고 있는 상기의 약물을 병용하면, 기존 약물의 사용량을 줄일 수 있고, 따라서 기존 약물들이 가지는 문제점들을 경감시킬 수 있다.

본 발명에 따른 알레르기성 질환 치료용 약학조성물은 탁월한 약학적 알레르기성 비염, 아토피성 피부염 및 천식치료 효능을 가진다. 따라서, 본 발명에서 알레르기성 질환 치료용 약학조성물의 유효량은 성인(60kg 체중)에 대해 1일 0.5g 내지 4.0g 이고, 바람직하기로는 1일 1.5g 내지 3.0g이다.

그리고 본 발명은 상기에서 얻은 생약 추출물을 통상적으로 사용되는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제 및 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제 등과 혼합하여 제조될 수 있으며, 통상적인 방법에 의해 정제, 캡슐제, 산제, 과립제, 현탁제, 유화제, 시럽제, 액제 등의 경구 투여용 제제나 통상의 방법으로 주사용 증류수에 용해하여 주사제로 사용할 수도 있다.

본 발명의 생약추출물은 급성독성 시험 결과 의약품으로 사용하기에 적합한 것이다.

•이하 본 발명을 제조에 및 실험에 의하여 상세히 설명한다.

하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것이며, 본 발명의 내용이 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

제조예 1> 본 발명에 따른 약학조성물의 제조

의이인 150g, 삼백피 150g, 어성초 112g, 길경 112g, 생지황 75g, 금은화 75g, 삼백초 75g, 생강 75g, 진피 75g, 백출 75g, 창출 75g, 황기 75g, 감초 75g, 박하 60g, 적작 37g, 대파 800g 및 건대추 50g과 1000℃ 이상에서 12시간 열을 가한 법제 모려본 2g을 혼합하고, 증류수를 가하여 이를 80℃에서 4시간 동안 서서히 가열하여 최종적인 부피가 6,000ml이 되게 한 다음, 이를 감압 농축하여 분무 건조시켜 500g의 분말을 얻었다.

제조예 2> 생리 등장액의 제조

<제조예 1>에서 제조된 생약분말에 생리식염수 100ml를 가하고 20% NaOH용액으로 pH 7.0이 되게 한 후, 2시간 정도 4℃ 이하로 보관하여 무기염류를 침강시킨 후 milipore filter(pore size 1.2μm)로 여과하였으며, 이 여과액을 20ml vial병에 담은 뒤 고압멸균기에 넣고 2기압 120℃, 30분 정도 고압멸균 시켰다.

실험예 1> 과산화지질(過酸化脂質)생성 억제작용 평가

Kiso등의 방법을 응용하여 실시하였는데 즉, trihydroxymethylaminomethane (Tris)-HCl 완충액(緩衝液)(167mM KCl, 74.4mM Tris, pH7.4) 500μl에 쥐 간 마이크로솜 현탁액(20mg of protein/ml) 100μl, 2mM NADPH 100μl, 10mM ADP 100μl 및 10% N,N-dimethylformamide(DMF) 수용액으로 각 농도로 조정된 검체용액 100μl을 보태서, 37℃에서 5분간 가온하였다. 그 후, 100μM FeCl₃ 100μl을 보태서 37℃에서 20분간 가온하였다.

컨트롤에는 검체용액 대신에 10% DMF 수용액 100μl을 보탤으며, 그리고 NADPH 100μl, FeCl₃ 100μl, ADP 100μl 대신에 물 300μl을 보탤다. 빙냉(氷冷)으로 의해 반응을 정지한 후, Ohkawa 등의 방법에 준하여 과산화지질량을 말론디알디하이드 (malondialdehyde)양으로서 산출하였다. 즉, 반응액 1ml에 8.1% sodium dodecyl sulfate(SDS) 수용액 200μl, 초산완충액(0.27M HCl를 포함한 20% AcOH를 10M NaOH로 pH3.5로 조정하였다.) 1.5ml를 보태서 비등수욕상(沸騰水浴上)에서 20분간 가열하였다. 가열 후 빙냉(氷冷)으로 반응을 정지하고 n-BuOH-pyridine혼액(1:5:1) 4ml를 보태서 세차게 혼합하였다.

그 후 800×g에서 10분간 원심분리한 후 떠오른 표면액체 532nm에서의 흡광도를 측정하였는데 그 결과는 도 1과 같다. 쥐 간(肝) 마이크로솜을 사용한 ADP/Fe³⁺ 유발 지질과산화 반응에 대하여 본 발명에 의한 생약 조성물은 농도의존적으로 억제작용을 나타내었으며, 양성대조인 BHT 보다도 강력한 저해작용을 나타냄을 볼 수 있다.

실험예 2> 쥐 경구투여에서의 항(抗)알레르기 작용(PCA법) 평가

경구 항알레르기약 트라니라스트(tranilast)를 양성 대상으로 하여 쥐의 피부 아나피라키시(anaphylactic)반응(PCA반응)을 사용하여 본 발명의 약학 조성물의 항알레르기 작용을 평가하였다. Koda 등의 방법 Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 87, 254(1988)에 준하였다. 체중 약 200g의 Wister계 숫컷쥐 등부위의 털을 깎고, 48시간 homologous PCA 역가(力價)가 1:128-1:256을 표시하는 항혈청을 생리 식염수로 희석하여 그 0.1ml를 등부위에 피내 주사하였다. 48시간 후, 단백질(蛋白質)으로 1mg의 DNP-BSA를 포함한 0.5% Evans blue 생리식염액 1ml를 꼬리정맥에 주사하였다. 30분후, 쥐를 방혈(放血)치사시켜 등부위 피부에 생긴 색소반(色素斑)을 절취하여 누출된 색소량을 구하였다. 즉, 절취한 피부를 시험관에 넣고, 1N KOH 1ml를 보태서, 37℃에서 하룻밤 방치하여 색소를 용출(溶出)시키며, 여기에 아세톤과 0.6N 인산혼액(13:5) 9ml를 보태서 흔들고 불용물(不溶物)을 여과제거한 후, 620nm로 여액의 흡광도를 측정하여 색소량을 측정하였으며 즉부부위의 색소침착정도를 확인하였다. 검체는 0.2% CMC - Na로 현탁하며, 쥐 체중 100g당 0.5 ml 투여가 되도록 조정하여 항원투여 2시간전에 경구 투여하였다.

도 2에서 볼 수 있듯이 본 발명에 의한 조성물은 경구투여에서도 항알레르기 활성을 나타내며, 대조군보다도 강한 활성을 나타냈다.

실험예 3> 5-리포키시게나제 저해작용 평가

Blackham등의 방법을 응용하여 실시하였는데 즉, 세포수가 1 × 10⁷cells/ml의 농도가 되도록 50mM 인산완충액으로 조정된 RBL-1 세포부유액을 초음파 처리하여 세포를 파괴하였다. 이 세포 호모지네이트(homogenate)액 500μl에 1% DMSO로 각 농도로 조정된 검체용액 10μl, 100mM CaCl₂ 10μl 및 10mg/ml 아라기돈(arachidonic)산의 MeOH용액 10μl을 보태서 37℃에서 3분간 가온하였다. 컨트롤(control)에는 검체대신에 1% DMSO 10μl를 보탤다. 또한, 불랭크(blank)에는 검체 대신에 1% DMSO 10μl를 보태고, RBL-1 세포부유액을 대신하여 50mM 인산완충액 500μl를 보탤다. 그 후, MeOH 500μl를 보태고 빙냉으로 반응을 정지하고 혼합한 후, 4℃, 2,000×g로 15분간 원심 분리하였다. 이어서 하기조건에서 HPLC에 의해 떠오른 표면액체 10μl중의 5-HETE량을 측정하였다.

<HPLC 조건>

컬럼: Cosmosil 5C18 (4. 6 × 150mm)

이동상; acetonitrile : 0.1%acetic acid=85 : 15

유 속 : 1.0ml/min

검출파장: 235nm

5-리포키시게나제 활성에 대한 저해율은 하기 수식에 의해 산출하였다.

$$\text{저해율(\%)} = ((\text{검체}-\text{블랭크}) \times 100) \div (\text{대조군}-\text{블랭크}) =$$

도 3에서 본 발명의 약학 조성물은 5-리포키시게나제에 대한 저해활성(IC50)이 약 18 pg/ml이며, 양성대상 화합물 BHT (IC50 = 28 pg/ml)보다 도 강한 억제활성을 나타냈다.

실험예 4> 항(抗)히스타민 작용 평가

염산 디펜하이드라민(diphenhydramine)을 양성대조로 한 본 발명의 생약 조성물의 모르모트 양관을 사용하는 마그너스법(magnus)에 의한 항(抗)히스타민 작용을 시험하였다. 하룻밤 절식시킨 모르모트를 박살(撲殺)하고, 회장(回腸)을 적출하여 약 2cm의 길이로 절취하여 일단을 isotonic transducer에 걸어 놓으며, 타단을 고정봉에 고정시킨다. 항온조(恒溫槽)의 온도를 37℃로 유지하며, 10ml의 Tyrode액 중에 O₂ 95%, CO₂ 5%의 혼합가스를 통기(通氣)하면서 약 30분간 방치한 후, 각 농도의 히스타민을 주입하여 트레아닝 후 세정 하여 검체투여 하에서 똑같이 히스타민에 관한 값을 산출하였다. 그 결과 도 4에 나타난 바와 같이 본 발명의 약학조성물의 항(抗)히스타민 효과는 대조군에 비해 2배에서 4배정도 이상 강하게 나타났다.

실험예 5> 트라이나이트로페닐(TNP)의 특이적 면역조정능력반응 실험

트라이나이트로벤젠술포산을 인산완충화생리식염수에 용해하고 (35mg/7.0ml, pH 7.5), 여기에 1ml의 양적혈구 페렛을 섞으면서 떨어뜨렸다. 차광상태에서 여러차례 섞으면서 30분간 실온에 방치한 후, 생리식염수로 2회 세정했다. 3,000 rpm으로 5분간 원심분리한 후, 생리식염수로 5 × 10⁹/ml로 제조하는데 6주령(週齡)의 암컷 BALB/c 마우스에게 5 × 10⁹개의 TNP-SRBC를 복강내로 투여하고, 혈청중의 항TNP항체를 디니트로페닐 소혈청 알부민(DNP-BSA)을 이용한 효소면역측정법(ELISA)으로 측정했다. 그 결과, 7일째를 피크로 하여 항TNP-IgM 및 항 TNP-IgG의 강한 항체생산이 확인되었다. 더구나 흉선결여(胸腺缺如)된 BALB/c 누드마우스에서는 양쪽 타입의 항체생산은 거의 확인되지 않았다. 상기한 실험계를 이용하여, 생리식염수에 용해한 본 신비전에 대한 히스타민가마우스(加mouse)γ-글로불린 (200mg/kg/day)에 있어서, TNP-SRBC 감작일로부터 7일간의 경구투여에 의한 항TNP항체생산에 대한 작용을 조사했다. 또, 양성대조로써 히스타민가마우스γ-글로불린 (200mg/kg/day)을 같은 형태로 피하주사하여 비교하였다. 본 실험예에 있어서의 결과를 도 5에 나타냈다. 또, 이하의 실험결과에 있어서는, Student's t-test를 이용하여 대조와의 평균치의 의미있는 차이를 구해 *표시를 했다. (*: p<0.05, **: p<0.005)

실험예 6> 호산구 증가 억제작용평가

6주령의 암컷인 BALB/c마우스에, 본 발명에 의한 약학조성물을 1일 30mg씩 경구투여 하면서 생리식염수로 1,000배 희석한 호그워드 화분액체를 개시일 및 제 1일째에는 100μl, 다시 100μl를 7, 14일째에 피하주사하여 감작했다. 제 21일째에 1,000배 희석된 호그워드항원 100μl를 마우스 복강내에 주사하고 반응을 유발했다. 유발후 24시간째에 복강침출세포를 회수하고, 감자염색으로 총세포수, 호산구수, 호중구수, 단핵세포수를 계측했다. 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이 대조군에서는 호산구수는 유발후 27일째에 최고로 되었으나 실험군을 50 mg/Kg처리군 경우 27일째 대조군 경우보다 약 4배의 억제효과를 보였다. 더구나, T세포가 결여되어 있는 BALB/c 누드마우스에서는 호산구경우 복강내에의 침윤은 전혀 인지되지 않았다.

실험예 7> 산화질소(NO) 생성 억제 효능 실험

본 발명에 따른 생약 조성물의 알레르기 비염 효능을 검증하기 위해서 비염유발은 Bellofiore 등의 변형에 준해서 각 군당 랫트 5마리씩 두 군을 준비하여, 첫째 날 Ovalbumin(OA) 1mg을 0.9% saline 1ml에 녹여 피하 주사하고, 6×10⁹ B. pertussis bacilli를 포함한 0.9% saline 1ml를 비강내로 주입하여 immunization을 시켰다. 전신적인 immunization후 14일째 랫트들에 2% (wt/vol) OA를 함유한 0.9% saline aerosol을 흡입시킴으로써 항원감작에 의한 알레르기성 비염을 유발시켰다. Aerosol은 ultrasonic nebulizer에 의해 만들어졌고, 20분간 흡입시켰다.

비염 유발 24시간 후, <제조예 2>에서 제조한 등장액을 투입시켰다.

상기의 랫트 10마리를 클로로포름으로 마취시킨 다음 심장천자하여 혈액을 EDTA(Ethylene Diamine Tetraacetic Acid Dipotassium Salt)가 들어 있는 시험관에 넣고 잘 섞어 응고를 방지한 뒤 원심분리기로 3000rpm으로 5분간 원심분리 후 상등액을 NO생성도를 확인하기 위해 96well에 50μl씩 옮기고 여기에 발색시약인 Griess시약(1% sulphanilamide, 0.1% naphlethyendiamine dihydrochloride, 4% phosphoric acid) 50μl 정도 처리하여 NO생성도를 570nm에서 ELISA reader로 측정하였다.

[표 1] Ovalbumin으로 유발된 비염 랫트들의 NO생성도

| 시료 | NO생성도(μM/well) |
|-----|----------------|
| 정상군 | 4.0±1.82 |
| 대조군 | 78.2±2.9* |
| 실험군 | 23.1±3.5 |

*p<0.05

상기 실험결과 정상군의 NO생성도는 $4.0 \pm 1.82 \mu\text{M}$ 이고, 대조군은 $78.2 \pm 2.9 \mu\text{M}$ 정도였으며, 본 발명의 조성물의 처리군은 $23.1 \pm 3.5 \mu\text{M}$ 로서, 대조군에 비해 유의한 차이를 나타내었다.

이러한 결과로부터 본 발명에 따른 생약 조성물이 관절염, 패혈증 등의 염증질환과 조직이식거부반응, 자가면역질환, 당뇨병 등의 면역질환 및 신경세포의 사멸을 유발하는 것으로 알려진 염증 유발물질인 산화질소(nitric oxide, NO)의 생성을 억제하는 효과가 있는 나타내는 것을 알 수 있다.

실험예 8> 비염과 기관지의 염증반응실험

상기 <실험예 7>에서와 같이 실험동물에 OA aerosol 흡입시킨 후, 다음날에 기관지세척을 시행하였다.

0.1% EDTA 2Na를 포함한 PBS(Phosphate buffered saline; Sodium Chloride 8g, Pottassium Chloride 0.2g, Disodium Hydrogen Phosphate 1.15g, Calcium Chloride 0.0005g, Magnesium Chloride 0.0005g) 4ml를 3번 주입하여 기관지를 세척한 후에 BALF를 얻었다. 부피는 원래 부피의 대략 평균 80%로 전체 세포수는 hemocytometer를 사용해서 측정하였으며 그 결과는 하기 표 2와 같다.

임파구수는 BALF에 lymphoprep(1.077 ± 0.0001 g/ml, Nycomed PharmaAs, Oslo, Norway)를 첨가하여 25분 동안 2,000 rpm에서 원심 분리한 후 상층을 버리고, 중간에 하얗게 부유해 있는 lymphocyte를 분리한 다음 PBS에 부유시켜 $200 \times \text{g}$ 에서 10분간 3회 원심 세척한 후, RPMI medium에 부유시키고, 광학 현미경을 이용하여 Trypan blue exclusion으로 세포수를 측정하였으며 그 결과는 도 7 및 8에 나타내었다.

[표 2]

| 시료 | 세포수($\times 10^5 / \text{ml}$) |
|-----|----------------------------------|
| 정상군 | 6.34 ± 1.25 |
| 대조군 | 27.43 ± 1.53 |
| 실험군 | 10.63 ± 0.34 |

상기 결과로부터 기관지 세정액 내의 총세포수는 정상군은 $6.34 \pm 1.25 \times 10^5 / \text{ml}$ 이고, 대조군에서는 $27.43 \pm 1.53 \times 10^5 / \text{ml}$ 이었으나, 본 발명의 조성물로 처리한 실험군에서는 $10.63 \pm 0.34 \times 10^5 / \text{ml}$ 이어서 대조군에 비해 유의한 감소효과를 나타냄을 볼 수 있다.

또한 임파구 수는 정상군은 $2.23 \pm 1.45 \times 10^5 / \text{ml}$ 이고 대조군은 $14.53 \pm 1.01 \times 10^5 / \text{ml}$ 이었으나, 본 발명의 조성물로 처리한 실험군에서는 $5.71 \pm 2.45 \times 10^5 / \text{ml}$ 로서 대조군에 비해 약 60% 정도 감소하였음을 볼 수 있다.

실험예 9> T세포의 CD4+/CD8+ 수적증가 확인

기도 세척액 내의 T-cell측정을 위해 RPMI 배지에 부유시킨 임파구 세포를 media A(pH 7.2 PBS+ 5% FBS with RPMI + 2M sodium azide)에 2×10^7 cells/ml의 세포수를 재부유시키고, 시험관에 세포부유액 $50 \mu\text{L}$ 씩 넣어서 시험관마다 1×10^6 개의 세포가 존재하게 하였다. 각 시험관에 FITC Anti-Rat CD4+ Monoclonal Antibody (Cedarlane, Ontario, Canada)와 PE Anti-Rat CD8+ Monoclonal Antibody(Cedarlane, Ontario, Canada)를 각각 $0.5 \mu\text{L}$ 씩 가하고, Vortex mixer로 잘 섞은 다음 이 혼합액을 빛이 차단되도록 알루미늄 호일로 싸우고 4℃에서 30분간 배양한 뒤, 4℃에서 PBS로 2회 세척하고, $50 \mu\text{L}$ 의 ice cold media B(pH 7.2 PBS + 0.5% Bovine serum albumin + 2M sodium azide)에서 cell pellet을 재부유시킨 후 형광현미경을 이용하여 임파구에 대한 CD4+ 및 CD8+ T세포율을 측정하였다. 세포수는 산출된 lymphocyte에 CD4+, CD8+의 비율을 곱하여 계산하였다.

[표 3]

| 시료 | CD4+($\times 10^4 / \text{ml}$) | CD8+($\times 10^4 / \text{ml}$) |
|-----|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 정상군 | 1.34 ± 0.21 | 1.12 ± 0.52 |
| 대조군 | 6.13 ± 1.53 | 5.02 ± 0.56 |
| 실험군 | 3.65 ± 2.34 | 1.62 ± 0.75 |

상기의 실험결과로부터 기도 세정액 내의 CD4+ 임파구 수는 정상군에서는 $1.34 \pm 0.21 \times 10^4 / \text{ml}$ 이고, 대조군에서는 $6.13 \pm 1.53 \times 10^4 / \text{ml}$ 정도였으나, 본 발명의 생약 조성물을 처리한 실험군에서는 $3.65 \pm 2.34 \times 10^4 / \text{ml}$ 로서 대조군에 비해 상당히 Th2에서 유래한 CD4+의 수가 유의한 감소효과를 나타내었으며, CD8+ 임파구 수는 정상군에서는 $1.12 \pm 0.52 \times 10^4 / \text{ml}$ 이고 대조군에서는 $5.02 \pm 0.56 \times 10^4 / \text{ml}$ 정도이었으나, 본 발명의 생약 조성물을 처리한 실험군에서는 $1.62 \pm 0.75 \times 10^4 / \text{ml}$ 로서 대조군에 비해 약 62%정도 감소하는 효과를 나타냄을 알 수 있다.

따라서 본 발명에 의한 생약 조성물이 비염유도에 의한 T임파구의 CD4+ 및 CD8+의 증가를 억제하는 데 효과적임을 알 수 있다.

실험예 10> 혈액 내 T세포의 감소 유무 확인

5% RPMI medium에 penicillin/streptomycin이 함유한 배지상에 10^4 세포를 둥근 유리판(slimb cover glass)가 들어 있는 6 well culture dish에 분주하고 37℃에서 24시간 배양하고, 본 발명의 제2에 1에서 제조된 약학조성물을 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되게 첨가하여 반응을 관찰하였으며, 폐액을 제거한 후 세포를 한번 PBS로 세척한 다음 세포를 metanol로 세포 위에 떨어지게 고정시킨 다음 PBS로 세척을 실시하고 3회 실행한 다음 0.2% BSA(bovine serum albumin)로 blocking후 1차항체인 Anti-mouse-CD4+/CD8+로 2차 항체인 anti-mouse-conjugated된 FITC용액으로 표지하여 호일로 빛을 차광하여 이를 1시간정도 방치하였다.

이를 형광현미경에서 관찰하였으며, 그 결과는 도 9에서 보는 바와 같이 정상군은 약한 반응을 보이거나 대조군은 강한 녹색형광의 수가 증가하는 경향을 보인 반면 실험군에서는 형광 발현이 크게 감소하고 수적으로 대조군에 비해 많이 감소하는 경향을 나타냄을 알 수 있다.

다음의 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 구체화한다. 다만 본 발명이 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

실시예 1> 주사제의 제조

실시예 1에서 제조한 분말 500mg을 증류수에 용해하고 pH 조절제로 pH 7.2로 조절한 다음 전체를 2㎖로 하여 앰플에 충전하고 멸균하여 약침 주사제를 제조하였다.

실시예 2> 정제의 제조

실시예 1에 의하여 제조된 분말 500mg, 유당 100mg, 전분 100mg, 테르페나딘 적량을 혼합하고 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

실시예 3> 산제의 제조

실시예 1에 의하여 제조된 분말 500mg, 유당 100mg, 지르텍 2mg을 혼합한 후 내부가 폴리에틸렌글로라이드로 코팅된 지포에 충전하고 씹혀 하여 산제를 제조하였다.

실시예 4> 캡슐제의 제조

실시예 1에 의하여 제조된 물추출물 500mg, 유당 50mg, 전분 50mg, 탈크 2mg, 염산수도에페드린 적량을 혼합하고 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

실시예 5> 액제의 제조

실시예 1에 의하여 제조된 물추출물 5g, 설탕 20g, 이성화당 20g, Xolair 적량에 정제수를 가하여 전체 100㎖에 대하여, 통상의 액제의 제조방법에 따라서 혼합하고 100㎖의 갈색병에 충전하고 멸균시켜서 액제를 제조하였다.

발명의 효과

이상에서 설명한 바와 같이 본 발명은 의이인, 상백피, 어성초, 길경, 생지황, 금은화, 삼백초, 생강, 진피, 백출, 창출, 황기, 감초, 박하, 적작, 파, 대추 및 모려의 생약을 유효성분으로 함유하는 알레르기성 질환 치료용 약학조성물을 제공한다.

특히 본 발명은 상기 실험예에서 알 수 있는 바와 같이 TNF- α (tumor necrosis factor- α), IL-1(interleukin-1), IL-6(interleukin-6), 프로스타글란딘(prostaglandin), 루코트리엔(luecotriene) 및 산화질소(nitric oxide, NO)와 같은 염증유발물질을 과도하게 유도하여 염증반응으로 진행되어 알레르기성 비염, 아토피성 피부염, 만성 천식 및 면역 과민반응 증상 등의 알레르기성 질환을 치료하는 효과가 있고, 원인과 체질을 불문하고 치료할 수 있으며, 폐(肺), 비(脾), 신(腎), 위(胃), 대장(大腸)에 작용하여 근본적인 치료가 가능하고, 장기간 계속 사용하더라도 소화장애, 어지러움증 및 속쓰림 등의 부작용이 없으며 알레르기성 질환이 염증반응으로 진행되어 유발되는 알레르기성 비염, 아토피성 피부염, 만성 천식 및 면역 과민반응 증상 등의 알레르기성 질환을 치료하는 효과가 있는 발명이다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

의이인, 상백피, 어성초, 길경, 생지황, 금은화, 삼백초, 생강, 진피, 백출, 창출, 감초, 황기, 박하, 적작, 파, 대추 및 모려의 생약을 유효성분으로 함유함을 특징으로 하는 알레르기성 질환 치료용 약학조성물.

청구항 2.

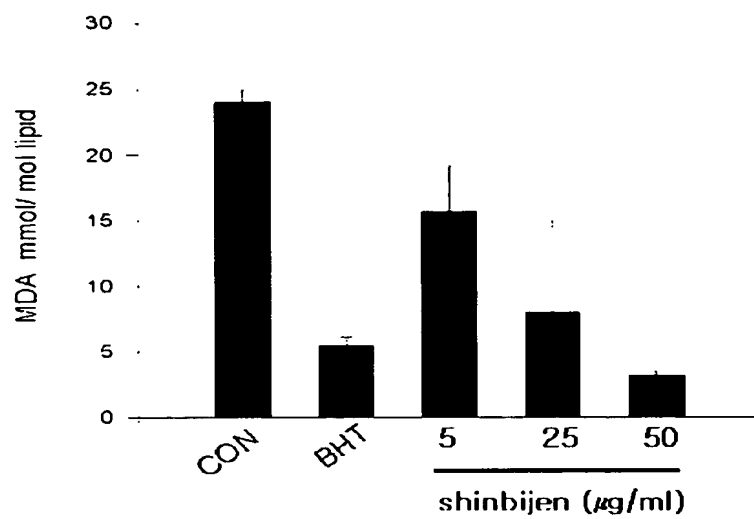
제 1항에 있어서, 상기 생약학조성물에 생약재 현상, 건강, 반하, 연교, 지실, 용안육, 신이, 세신, 창이자, 하수오, 백지, 방풍, 사삼, 황기, 계지, 단삼, 소자, 포공영, 시호, 오배자, 자초, 형개, 곽향 중 선택된 1종 이상의 생약을 첨가된 것을 특징으로 하는 알레르기성 질환 치료용 약학조성물.

청구항 3.

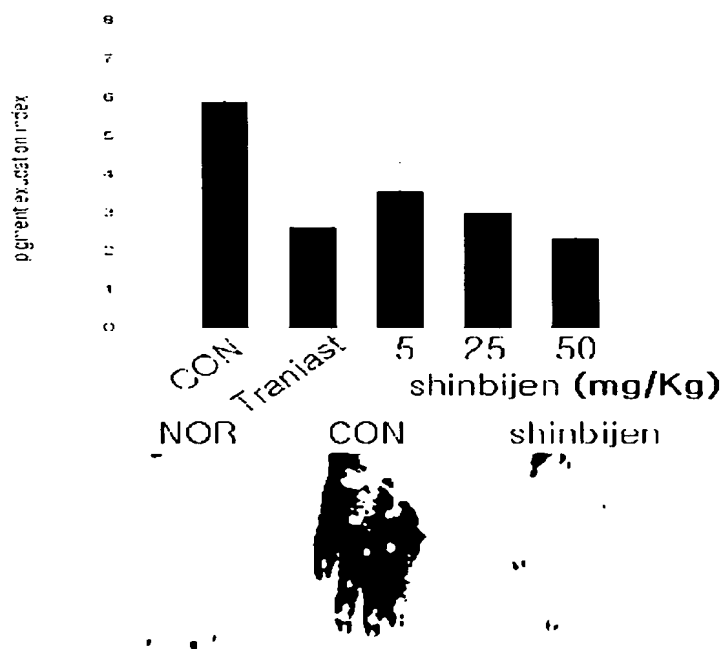
제 1항 또는 제2항에 기재된 약학조성물을 유효성분으로 함유하는 주사제, 정제, 산제, 캡슐제, 액제의 형태 중에서 선택되는 알레르기성 질환 치료용 약학제제

도면

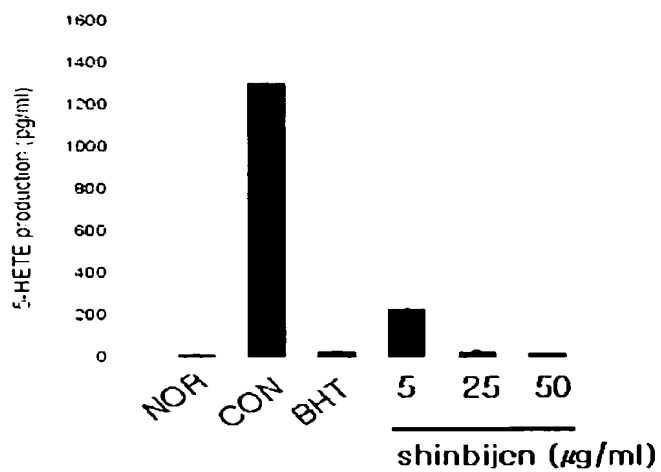
도면 1



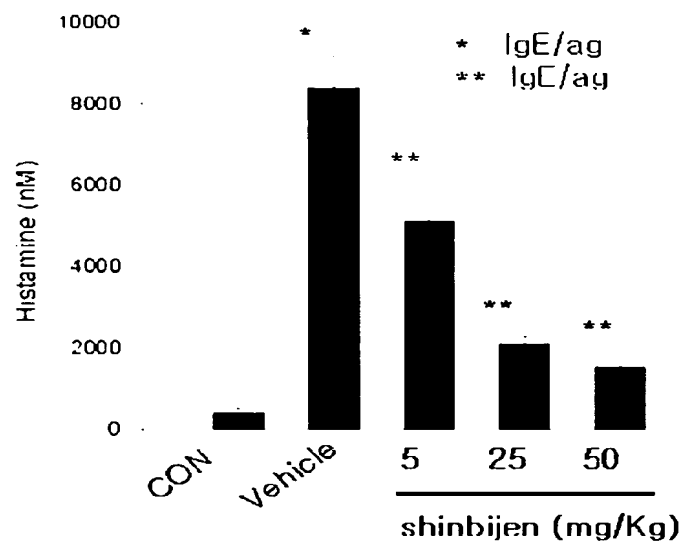
도면 2



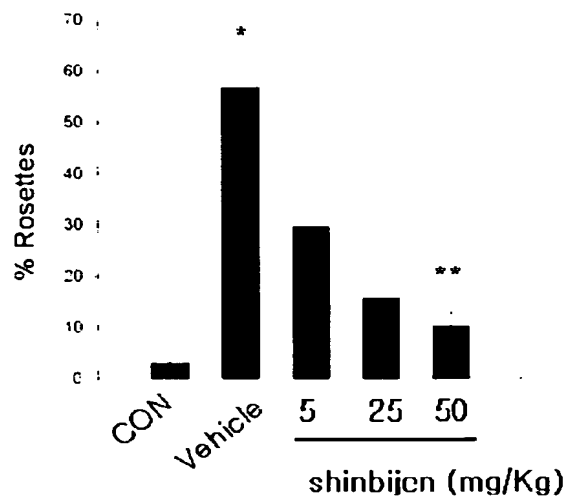
도면 3



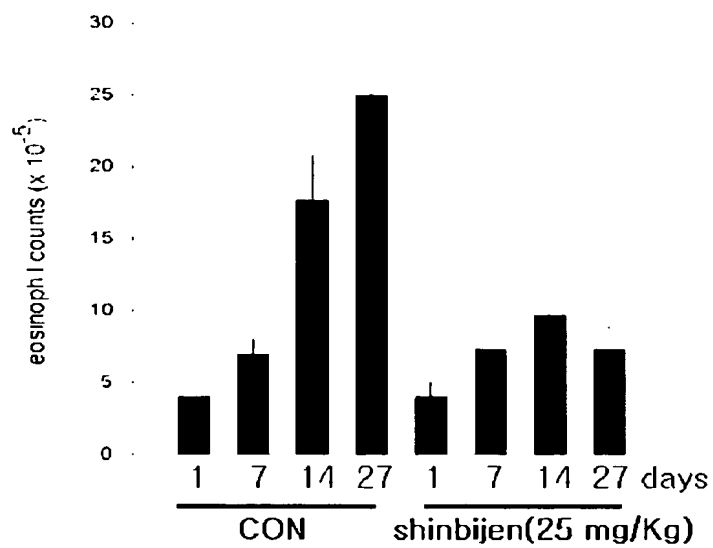
도면 4



도면 5



도면 6



도면 7

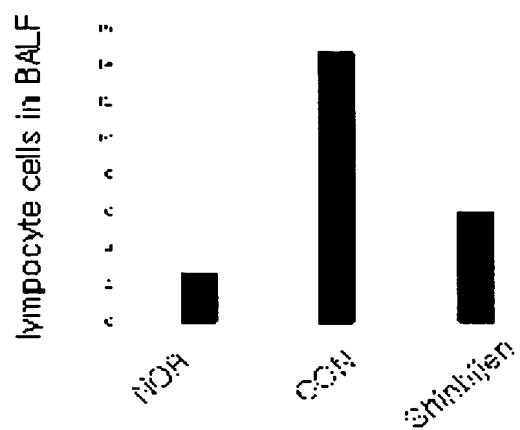
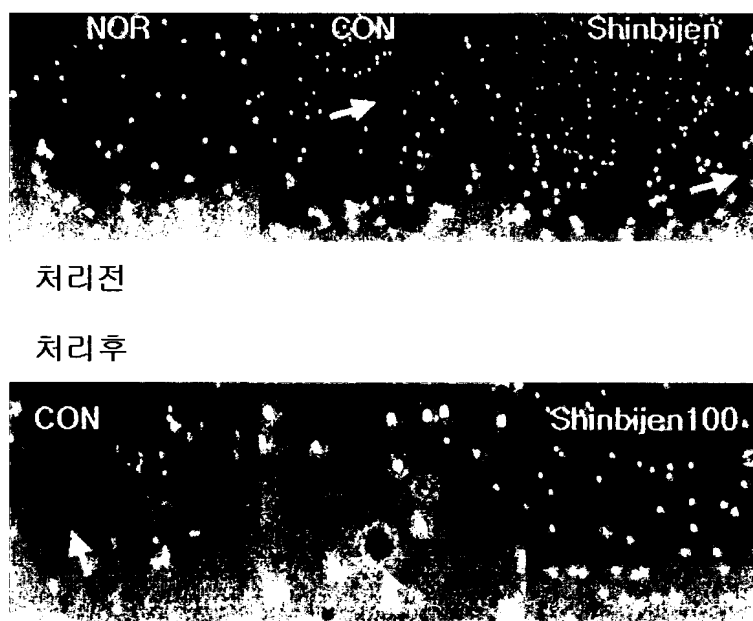
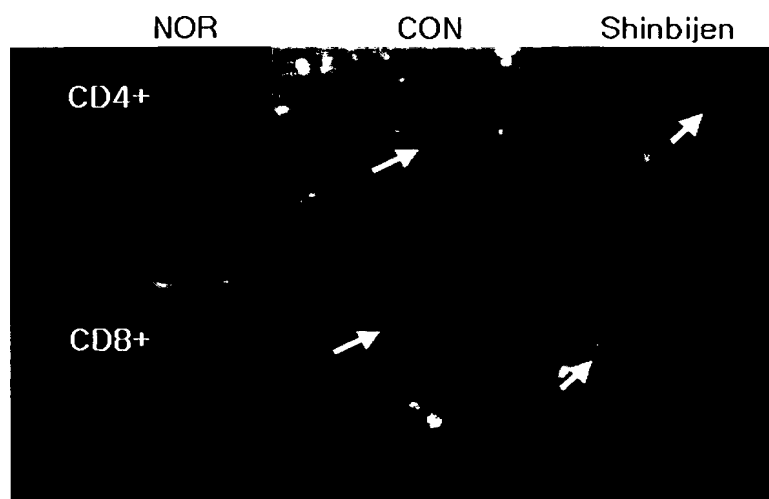


Fig 2. Effects of shinbijen extracts on the lymphocyte in fluid of ovalbumin induced rhinitis rat

도면 8





**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record.**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.